牛 乳 の 抗 体 蛋 白 質 に 関 す る 研 究 (4)

Studies of the Antibody Produced in Milk (Part 4)

免 疫 粉 乳 に よ る 動 物 試 験

Animal test of powder immune milk

(昭 和 40 年 2 月 9 日 受 理)

仁 木 達

(Tôru Niki)

祐 川 金次郎

(Kinziro Sukegawa)

繁 田 晴 美

(Harumi Handa)

A powder immune milk was prepared after pasteurizing the immune milk at 63°C for 30 minutes, which was obtained from the cow which had been injected into her muscles or udders with antipertussis vaccine during the period of pregnancy.

The powder immune milk was given to rabbits orally or by intramuscular injection as isolated γ -globulin or albumin, respectively.

1) A cow 2 months before parturition was injected into her udders with antipertussis vaccine. The total dose of 5,760 billion was divided into 6 equal doses at week intervals.

2) The colostrum from this cow caused positive agglutination with pertussis (10 billion) at 2 γ /ml of whey nitrogen and the normal milk within 40 days caused the same agglutination at 4 γ /ml of whey nitrogen.

3) The powder immune milk prepared by the ordinary procedure after the pasteurizing had lost a half of the agglutination titer.

4) An experimental diet was prepared from the powder immune milk. The diet gave positive results at 8 to 12 γ /ml of whey nitrogen content.

The diet was given orally in 30% milk solution at a dose of 100 to 200 ml/day to rabbits.

After the feeding 5 in 10 rabbits acquired the antibody in blood, the maximum level of which arrived to 32 times the control level.

After the cease of the feeding on the experimental diet, the rabbits showed a gradual decrease in their blood antibody. Several of them lost a whole of agglutinin in blood.

5) The γ -globulin or the albumin—isolated from the powder immune milk—was dissolved in physiological salt solution in the concentration of 200 mg/5 ml and was given to rabbits by intramuscular injection. Injection of the γ -globulin gave an increase in blood antibody titer by 16 times, whereas that of the albumin was ineffective.

Abderhalden の防禦酵素理論以来、生後1週間ぐらいまでの乳幼児は、乳を通じて母体から免疫性を得るといわれてきたが、それ以後の幼児あるいは成人には乳を飲んで免疫性を得ることが不可能であるという確定的な結果は得られていない。

問題になるのは、成人においても、また異種動物の抗体蛋白質を消化器管から吸収した場合、その免疫抗体がそのままの活性を保持できるかということである。従来からの学説によれば、免疫抗体が消化器から吸収された場合、その効力を失うことなく血液循環器管に含有されるようになるのは、生後数日間のみとされていた。しかし最近では、蛋白質の消化吸収については、アミノ酸より

もかなり大きなペプチドで吸収される可能性も実証されているので、生後数日間以降の乳児あるいは成人についても、抗体活性を失わない状態での吸収の可能性も考えられる。ただ、初乳の場合には、比較的抗体活性が高いため、現象的に初乳飲用時期にのみ抗体蛋白質の吸収があったようにも考えられる。さらに、すでに第2報で報告したように、試験管内でかなり消化した抗体蛋白質もその活性を一部保持したままで存在するので、免疫活性を失わないでの吸収の可能性も十分あり得ることになる。

経口的に得られる乳汁からの免疫性は、一種の受動免疫で、疾病およびアレルギー性反応によって得た能動免

疫と比較してみても生体の被害はなく、その免疫性は、ときどき経口的に免疫源を供給している間持続することになるであろう。

この報告は、人工免疫乳から製造した育児用特殊調整粉乳を、家兎に対して経口的投与および免疫乳、非免疫乳から分離した γ -グロブリンおよびアルブミンを家兎に注射した場合の血中抗体価を測定した結果について報告する。

実験方法

1. 乳牛に対する免疫法

分娩2カ月前の妊娠牛に、乳頭から1週間間隔に市販百日せきジフテリア混合ワクチンを1乳頭に20 ml 宛1回2乳頭に交互、計6回、240 ml (百日せき菌数 5,760 billion) を注入した。

また、分娩前の乳牛に、皮下および筋肉注射によって百日せき菌ワクチンを免疫した。初回 100 billion, 3日間隔に漸次増量した。10回免疫、百日せき菌数1,580 billion 免疫後分娩したが、分娩後も免疫を継続し、計20回 7,765 billion 注入した。

2. 免疫粉乳の製造法

免疫乳を63°C、30分間低温殺菌後、濃縮、通常の噴霧乾燥法によって特殊調整粉乳を製造した。

3. 動物飼育試験

生後2カ月の家兎10匹に対して、30%粉乳溶液を1カ月間は100 ml/day を1日2回に分けて自由に摂取させ、次の1カ月間は200 ml/day を同様に与えた。1週間ごとに採血して、血中抗体価を凝集反応によって求めた。粉乳による飼育中止後は、固形飼料を与え、血中抗体の消失状態を経時的に測定した。

4. γ -グロブリン、アルブミンの注射

免疫乳および非免疫乳から分離した γ -グロブリンおよびアルブミンの200 mg/5 ml 生食液を、3日ごとに筋肉注射して血中抗体の有無を測定した。 γ -グロブリンおよびアルブミンは硫酸アンモニウム塩析で分別した。

実験結果

百日せきジフテリア混合ワクチンを6回、計240 ml (百日せき菌数 5,760 billion) を乳頭から注入後、分娩した乳牛から搾乳した乳汁中の百日せき菌に対する凝集価の経時の変化および蛋白質含量は、図1に示した。乳汁中の凝集価の測定は、牛乳を遠心脱脂後、pH4.6でカゼインを除き、滲液のpHを6.8にしたものを用いた。すなわち、ホエー中窒素の γ 数で示した。

蛋白質含量の経時の変化から、初乳の蛋白質組成と考えられるのは分娩後4日ぐらいまでである。百日せき菌

10 billion と反応させた場合には、初乳時期ではホエー窒素2 γ 、以後40日までの測定では4 γ で凝集反応陽性を示し、第1報の結果とはほぼ同様である。

図1 免疫乳の蛋白含量および抗体価の経時の変化

このような性質の牛乳を63°C、30分間加熱殺菌、通常の方法で真空濃縮、噴霧乾燥した粉乳の蛋白組成および抗体価は表1のようである。なお比較のため普通全脂粉乳および生乳の組成も示した。63°C、30分の低温殺菌免疫乳では生乳とはほとんど同程度の未変性ホエー蛋白質が含まれている。すなわち粉乳を溶解後、pH4.6でカゼインを沈殿除去した滲液の窒素量は、全蛋白質に対する比率からみて、生乳の場合よりもむしろ若干高い値を示している。一方、通常全脂粉乳(高温殺菌処理)では、ホエー蛋白質の大部分が熱変性されるために、pH4.6でカゼインとともに沈殿除去され、ホエー蛋白質として定量される窒素量が極めて少ない。

表1 免疫粉乳の蛋白組成および抗体価

試料	全蛋白%	未変性ホエー蛋白質%	ホエー蛋白質/全蛋白	凝集価 (ホエー N. r)
免疫粉乳1*	34.18	10.62	31.07	3
2	26.08	7.37	28.26	4
3	23.29	7.26	31.17	4
4	23.29	6.71	28.81	6
5	23.09	6.71	29.06	6
6	23.09	6.43	27.84	6
7	23.29	6.71	28.81	12
対称全脂粉乳	24.87	2.23	8.97	-(2,000)
生乳	3.01	0.67	22.29	-(2,000)

* 免疫粉乳の番号は、分娩搾乳後各5日間の牛乳で製造したものである。

表 2 家兎飼育に用いた特殊調整粉乳の組成

試 料	脂 肪	蛋 白 質	乳 糖	し ょ 糖	灰 分	水 分	未 変 性* ホエー蛋白	ホエー 蛋白/ 全蛋白	凝 集 価 (ホエー N. r)
1	% 19.64	% 13.77	% 47.56	% 10.17	% 3.84	% 1.27	% 4.57	% 33.11	8
2	% 20.22	% 14.77	% 46.29	% 9.24	% 4.09	% 1.65	% 4.62	% 31.28	12

* 未変性ホエー蛋白質とは、pH4.6 でカゼインとともに沈殿しない窒素化合物のことを意味する。

表 3 免疫粉乳で飼育した家兎血中凝集価の変動

家兎 No.	30%溶液 100 ml/day				30%溶液 200 ml/day				固 形 飼 料			
	1 w	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w	7 w	8 w	1 w	2 w	3 w	4 w
1	16	32	32	8	8*	2	2	—	8	4	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	16	16	8	8	8*	8	2	8	8	16	8	4
4	—	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	32	32	32	32	32*	16	16	8	16	16	16	16
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	4	4	4	2	4	4	8	8	8	8	8	4
9	32	32	16	16	32	—	—	—	—	—	—	—
10	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注) 表中数字は血清希釈倍数である。希釈は0.85%滅菌食塩水。

* 4 w以降粉乳溶液を中止して固形飼料投与。

免疫粉乳の凝集価は、搾乳直後の凝集価に比較して僅かに低下している。一方、対称全脂粉乳および生乳から分離したホエー窒素では2,000 γ でも反応を示さなかった。このような条件で製造した免疫粉乳の細菌数にも問題はなかった。

これらの粉乳を特殊調整粉乳として調査したものの組成および抗体価は表2に示した。

表2に示した凝集価が表1の約 $\frac{1}{2}$ に低下しているのは、特殊調整粉乳の組成にしたため、全体の蛋白質含量も低く、さらに非免疫乳からのホエー蛋白質が混合されたためである。

ホエー窒素8~12 γ で凝集を示したことは、百日せき菌 10 billion と凝集する上記粉乳の全蛋白質量に換算すると、試料1では0.16 mg/ml、試料2では0.22 mg/mlということになる。

特殊粉乳を生後2カ月の家兎に30%溶液として、最初の4週間は、1日に100 mlを2回に分けて自由に摂取させ、次の4週間は200 mlとした。30%溶液とした理由は、家兎の乳汁は文献値によれば、全固形約30%、脂肪10.5%、蛋白質15.5%であるから、この点を考慮したものである。蛋白質も大体ヒト乳児と同様3.5~4.0g/kg体重になるように与えた。

飼育中は毎週心臓から採血して血中抗体凝集価を経時

的に測定した。その結果は表3に示した。

免疫粉乳で家兎10匹を飼育した結果では、確実に凝集を示したのは5匹であったが、他の2匹は反応を認めたが不完全であった。血中凝集価も各家兎によって異なり最大は32倍であった。次に免疫粉乳で1カ月間飼育後中止して固形飼料を投与した家兎の血中凝集価は、次第に低下の傾向を示し、中には全く凝集を示さなくなるものもあった。また投与2カ月後は、全部固形飼料としたが、その後2カ月でも凝集を示すものもあり、かなり持続するが、いずれも低下の傾向を示す。

表 4 γ -グロブリン、アルブミン注射による血中抗体の変動*

試 料	1 回注射後	2 回	3 回
免疫乳 γ -グロブリン	8	16	16
非免疫乳 γ -グロブリン	—	2	—
免疫乳アルブミン	—	—	—
非免疫乳アルブミン	—	—	—

* 採血は注射2日後実施。

次に免疫乳を経口的に与えても血中に凝集素の認められなかった家兎について、免疫乳および非免疫乳から分離した γ -グロブリンおよびアルブミンを200mg/5 ml

生理食塩水として筋肉注射した。3 日間隔で 3 回注射、各回ごとに採血して血中抗体を測定した。表 4 に示したごとく、 γ -グロブリン注射家兎にのみ凝集価が認められたが、非免疫乳から分離した γ -グロブリン注射では極めて弱く、消失も速かであった。また、免疫抗体を筋肉注射して得られた血中抗体は、経口的に与えた場合に比較して持続的ではなく、中止後は速かに消失することは興味あることである。

考 察

古く Escherich は、乳児が馬の血清からジフテリヤ抗毒素を経口的に吸収しうることを認め、Salge は、ジフテリヤに対して免疫した母親の乳汁を与えた時は直ちに小児は免疫されるが、免疫した山羊の乳汁を小児に与えても免疫性は見出されなかったことをすでに今世紀の初頭に報告している。

人乳による免疫体の乳児への移行については¹⁾、経口的に人乳を摂取した場合には、乳児の血中抗体の保有量を増加させたり、保有期間を延長させ得ることはできないと述べている。その考え方の理由としては、抗体の蛋白消化酵素による破壊および胃中の塩酸性による抗体蛋白の変性をあげている。さらに免疫家兎とその仔兎および対称家兎からの仔兎を母仔交換して授乳させることによって上述のことを確認している。ただしこの実験では測定し得た抗体についてのことで、感染防禦性の免疫体または抵抗物質については不明で、実験も行っていない。例えば、ポリオの免疫による血中抗体価の感染阻止効果は、8~10倍が最小限であるといわれているが、ポリオワクチン投与によっても全部が血中抗体の上昇を示すものとはかぎらず、16例中 2~3 例より血中抗体産生が認められない実験例もある。このような場合にも血中抗体が証明されないのに感染を阻止するだけの抵抗力をもったものがあることである。

Petersen らによると、ヒトによる牛乳からの抗体吸収に対して、従来から否定的な報告が出されているのは、低い抗体価をもった牛乳について試験し、しかも高い割合の吸収を求めた点に原因があったと述べている²⁾。彼らは、Streptococcus の多価ワクチンで免疫した牛からの牛乳を、1 日 1 l 成人に投与したところ、明らかに最初陰性のものが血清に抗体が表われ増加しつづけたという。さらに免疫牛乳のリウマチ様関節炎および枯草ぜんそくの症状を軽減する効果を指摘している³⁾。一方、Dixon⁴⁾ は多数の臨床実験によって、ジフテリヤワクチンによって得られた免疫牛乳を乳児に与えても抗体の有意な吸収は認められなかったという。Sherman⁵⁾ は、免疫牛乳の枯草ぜんそくに対する効果を認めていない。

百日せき菌で免疫した乳牛からの人工免疫粉乳で家兎を飼育した場合には、一応血中抗体を認出し得たが、第 3 報に報告したような、分娩直後の仔牛に対する免疫初乳投与のごとき高単位の血中抗体産生は得られない。百日せき菌の抗体は、血中に証明される量は非常に少なく、組織中に多く存在しているといわれる。すなわち、組織免疫性のものであるから、抗体の経口摂取による移行の問題も血中のみでなく、組織抗体の測定または感染防禦試験も実施しなければならない。

要 約

百日せきワクチン妊娠牛の乳頭または筋肉に注射、免疫した乳牛から得られた牛乳を、63°C、30 分間の低温殺菌して粉乳を製造した。この免疫粉乳を家兎に経口投与また分離した γ -グロブリンおよびアルブミンを筋肉注射して、次のような結果を得た。

1. 分娩前 2 カ月の妊娠牛に対して、乳頭から百日せきワクチン 1 回に 2 乳頭、菌数として、960 billion、1 週間間隔に 6 回、計 5,760 billion を免疫した。また分娩前乳牛に皮下および筋肉注射で、3 日間隔に 20 回、計 7,765 billion 免疫した。

2. この方法で免疫した乳牛からの初乳では、ホエー窒素として 2 γ 、以降 40 日までの免疫乳では 4 γ で百日せき菌 10 billion と凝集反応を示した。

3. 免疫乳を 63°C、30 分低温殺菌し、常法によって粉乳を製造した。この粉乳の凝集価は免疫乳の約 $1/2$ に低下した。

4. 免疫粉乳を特殊調整粉乳として配合した。このときの凝集価は、ホエー窒素として 8~12 γ である。

家兎に対して、30% 溶液を 100~200 ml/day 経口投与した結果、10 匹中 5 匹には血中抗体が認められ、最高 32 倍に上昇した。

投与中止後は血中抗体価が次第に低下し、全く消失するものもあった。

5. γ -グロブリンおよびアルブミンを 200 mg/5 ml 生理食塩水として家兎に筋肉注射した結果では、免疫乳から分離した γ -グロブリン注射家兎のみが、血中抗体 16 倍となった。しかし、注射中止後は血中抗体が速かに消失した。

文 献

- 1) 和泉成之：日本小児学会報告 (1957)
- 2) Campbell, B. and Petersen, W. E.: *Milchwissenschaft*, 14, 469 (1959)
- 3) Petersen, W. E.: *Milk Dlr.*, 52, 36 (1963)
- 4) Dixon, F. J. et al: *J. Immunol.*, 83, 437 (1959)
- 5) Sherman, W. B. and Freedman, S.: *J. Allergy*, 31, 476 (1960)

(雪印乳業技術研究所)